

09/486142 15

BREVET D'INVENTION

09/486

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

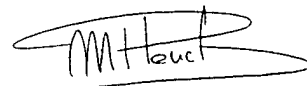
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 JUL. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

DEMANDE A L'INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

148 25272/250798

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL CREE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

BREVET D'INVENTION; CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Monsieur André BOURGOUIN BEAUFOR IPSEN - S.C.A.F. Direction de la Propriété Industrielle 42 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS n° du pouvoir permanent LC 041 références du correspondant RS CAS 252 téléphone 01 44 30 43 43	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) Oligonucléotides permettant l'identification de précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 0 8 1 9 7 1 8 5 CUSP APP NAF 7 4 1 J Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 51/53 rue du Docteur Blanche 75016 PARIS		Forme juridique Société Anonyme Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requête pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requête antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80%;">DIVISION DEMANDÉE LE 12.03.98 BÉNÉFICIAIRE DE LA DATE DE DÉPÔT DU 26.08.97 DE LA DEMANDE INITIALE N° 9710643 (article L. 612-4 du code de la propriété intellectuelle)</div>			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) A. BOURGOUIN, mandataire		SIGNATURE DU DÉPOSÉ À LA RÉCEPTION A767	

Oligonucléotides permettant l'identification de précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées

La présente invention a pour objet de nouveaux oligonucléotides et leur application comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour les précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées et, ainsi, l'identification de nouvelles hormones polypeptidiques amidées. L'invention concerne donc des oligonucléotides dont la séquence nucléotidique est décrite ci-après et une méthode d'identification des précurseurs d'hormones.

Les hormones polypeptidiques amidées sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui subit une maturation. Cette maturation consiste en une réaction d'amidation.

La réaction d'amidation de l'extrémité C-terminale est une réaction caractéristique des hormones polypeptidiques amidées. Cette réaction, qui intervient sur le précurseur d'une ou plusieurs hormones, permet la maturation de l'hormone et assure également sa biostabilité dans le milieu physiologique : le groupement amide formé est moins vulnérable que la fonction acide libre. L'hormone est alors plus résistante aux carboxypeptidases, elle reste active plus longtemps dans la cellule et garde une affinité optimale avec son site récepteur.

L'amidation a été largement décrite ("Peptide amidation", Alan F. Bradbury et Derek G. Smyth, TIBS 16 : 112-115, March 1991 et "Functional and structural characterization of peptidylamidoglycolate lyase, the enzyme catalyzing the second step in peptide amidation", A.G. Katopodis, D.S. Ping, C.E. Smith and S.W. May, Biochemistry, 30(25) : 6189-6194, June 1991), son mécanisme est le suivant :

1- clivage de la chaîne polypeptidique précurseur de l'hormone par une endoprotéase au niveau de deux acides aminés basiques qui sont l'arginine et/ou la lysine.

2 - ensuite, se produisent deux clivages par la carboxypeptidase qui conduisent à l'intermédiaire glycine étendu,

3 - l'enzyme PAM (Peptidyl-glycine- α -Amidating Monooxygenase) comprend deux activités enzymatiques distinctes : dans un premier temps, elle convertit l'intermédiaire glycine étendu en dérivé α -hydroxyglycine, la sous unité de l'enzyme PAM qui intervient est la PHM (Peptidyl-glycine- α -Hydroxylating Monooxygenase). Le dérivé obtenu sert de substrat à la deuxième sous unité de la PAM (notée PAL : Peptidyl- α -hydroxyglycine α -Amidating Lyase) qui fixe la fonction amine de la glycine sur l'acide aminé immédiatement adjacent du côté N-terminal et libère le glyoxylate.

De ce fait, cette invention permet un gain de temps et d'argent non négligeable dans un secteur où les dépenses de Recherche et Développement représentent une proportion très importante du chiffre d'affaires.

La présente invention permettra également l'étude pharmacologique de substances actives ayant un rôle physiologique fondamental dans l'organisme des mammifères : les hormones et plus particulièrement les neurohormones polypeptidiques amidées. Disposant en premier lieu des ADNc correspondant aux substances actives, il sera alors possible d'introduire par génie génétique le vecteur cloné pour mener la synthèse des hormones ayant une application thérapeutique par des micro-organismes.

L'invention a d'abord pour objet un oligonucléotide OX simple brin pouvant s'hybrider dans des conditions douces avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

On entend par nucléotide une unité monomère de l'ARN ou de l'ADN ayant la structure chimique d'un ester phosphorique de nucléoside. Un nucléoside résulte de la liaison d'une base purique (purine, adénine, guanine ou analogues) ou d'une base pyrimidique (pyrimidine, cytosine, uracile ou analogues) avec le ribose ou le désoxyribose. Un oligonucléotide est un polymère de nucléotides désignant une séquence amorce, une sonde ou un fragment d'ARN ou d'ADN.

Les oligonucléotides cités peuvent être obtenus par synthèse, il existe une méthode automatisée de référence qui est décrite dans les publications suivantes : "DNA synthesis" de S.A. Narang, Tetrahedron, 39, 3 (1983) et "Synthesis and use of synthetic oligonucleotides" de K. Itakura, J.J. Rossi et R.B. Wallace, Annu. Rev. Biochem., 53, 323 (1984).

De préférence, OX peut s'hybrider dans des conditions stringentes avec OY.

De façon plus préférentielle, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY de séquence Y2-Y3-Y4-Y5.

De façon encore plus préférentiellement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4 ou Y2-Y3-Y4.

Particulièrement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY tel que Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9 dans laquelle Y6 représente un trinucéotide

quelconque. Y8 représente un trinucéotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant 1 à 12 nucléotides.

L'invention a plus particulièrement pour objet un oligonucéotide OY tel que Y1 et Y9 sont supprimés.

5 L'invention a tout particulièrement pour objet un oligonucéotide OY, caractérisé en ce que Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 représente un trinucéotide codant pour Lys, Y4 un trinucéotide codant pour Arg et Y5 une séquence de trois trinucéotides codant pour Ser-Ala-Glu.

10 La présente invention concerne aussi un oligonucéotide simple brin OZ, caractérisé en ce qu'il comprend de 15 à 39 nucléotides et est capable de s'hybrider avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées, ladite séquence ayant pour formule Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 dans laquelle Z1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z1 est supprimé, Z2 et Z3 représentent deux trinucéotides codant pour Leu, Z4 et Z5 représentent deux trinucéotides codant pour deux acides aminés quelconques, Z6 représente un trinucéotide codant pour Leu, et Z7 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z7 est supprimé.

Dans cette invention, on entendra par hormone, les hormones polypeptidiques amidées du système endocrinien, et plus particulièrement les neurohormones.

20 La séquence consensus signal est une séquence portée par les précurseurs des protéines qui sont sécrétées par les cellules après leur maturation.

La présente invention concerne enfin un ensemble d'oligonucéotides OX ou OZ tel qu'il constitue une librairie combinatoire.

25 Dans l'invention décrite, on entend par librairie combinatoire un ensemble d'oligonucéotides synthétisés en prenant pour modèle une séquence nucléotidique codant pour une séquence d'acides aminés dont certains peuvent être variables. Du fait de la dégénérescence du code génétique, on obtiendra un ensemble d'oligonucéotides différents.

Un autre objet de l'invention est une méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

30 1 - obtention d'une banque d'ADN;

souvent des complexes du lanthanide), un groupe contenant de la biotine ou ester d'acridine, un composé fluorescent (fluoresceine, rhodamine, Texas red) ou autre.

On préférera tout particulièrement une méthode d'identification de précurseur d'hormone polypeptidique amidée telle que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire d'oligonucléotides OX.

L'invention a encore pour objet une méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, qui comprend les étapes suivantes :

1 - obtention d'une banque d'ADN;

2 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides OX et un autre ensemble d'oligonucléotides OZ;

3 - identification de la séquence d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec l'oligonucléotide OX et qui a été amplifiée par la réaction de PCR;

4 - identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

On entend par fragment d'intérêt la séquence d'ADNc codant pour le précurseur d'une ou plusieurs hormones polypeptidiques amidées.

La réaction d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) nécessite une préparation d'ADN dénaturé par chauffage à 95°C. Ensuite, cette préparation est appariée à un excès de deux oligonucléotides complémentaires aux brins opposés de l'ADN, de part et d'autre de la séquence à amplifier. Chaque oligonucléotide sert ensuite d'amorce à une DNA polymérase (extraite de bactéries thermophiles du type *Thermus aquaticus* : Taq polymérase) pour la copie de chacun des brins de l'ADN. Ce cycle peut être répété, de manière automatisée, par dénaturations-renaturations successives.

Il existe de nombreuses références détaillant les protocoles du PCR : Brevets US n° 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159 et 4.965.188, "PCR technology : principles and applications for DNA amplification", H. Erlich, ed. Stockton Press, New York (1989) et "PCR protocols : a guide to methods and applications", Innis et al., eds. Academic Press, San Diego, California (1990).

De préférence, ladite banque d'ADN est une banque d'ADNc.

Plus préférentiellement, ledit oligonucléotide OX est détectable à l'aide d'un agent de marquage tel que le ³²P ou la digoxigénine.

3 - identification de la séquence d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide OX;

4 - identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

5 La séquence consensus universelle est une séquence portée par le vecteur dans lequel est cloné l'ADN de la banque. Cette séquence peut servir d'amorce pour le séquençage. Les séquences nucléotidiques de ces primers sont disponibles dans : Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., "*Molecular cloning, a laboratory manual*", 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10 La réaction du PCR nécessite que deux oligonucléotides se fixent sur l'ADNc cloné dans un vecteur pour que son amplification ait lieu. Dans le cas où l'on ne connaît qu'une seule séquence propre au fragment d'ADN à amplifier, une solution pour contourner ce problème est d'utiliser un oligonucléotide qui pourra s'hybrider avec une séquence nucléotidique propre au vecteur dans lequel a été cloné l'ADNc, telle qu'une séquence consensus universelle.

De préférence, ladite banque d'ADN est une banque d'ADNc.

On préférera un oligonucléotide OY détectable à l'aide d'un agent de marquage tel que le ^{32}P ou la digoxigénine.

20 On préférera plus particulièrement une étape d'amplification utilisant une librairie combinatoire d'oligonucléotides OX.

1.2. Amplification d'une portion du précurseur de la CCK à partir de la banque de plasmides ainsi préparée.

1.2.1. Etablissement des séquences des deux oligonucléotides nécessaires à la réaction de PCR.

- 5 L'un de ces deux nucléotides contiendra la séquence complémentaire à celle codant pour le site d'amidation de la CCK, ce site est connu et a pour séquence Gly-Arg-Arg-Ser-Ala-Glu. Cet oligonucléotide, que l'on nommera *oligo CCK amid*, a pour séquence nucléotidique :

5' CTCAGCACTGCGCCGGCC 3'

- 10 Le second oligonucléotide, noté *oligo CCK 5'*, correspond à la séquence consensus signal :

5' GTGTGTCTGTGCGTGGTG 3'

- 15 La taille du produit d'amplification attendu est de 315 paires de bases, c'est la distance existant entre les séquences correspondant à ces deux oligonucléotides sur la séquence précurseur de la CCK.

1.2.2. Réaction de PCR.

- 20 On prépare une dilution D₁ contenant 1 µl d'enzyme Taq polymérase Goldstar 5 U/µl (cf. Reynier, P., Pellissier, J.F., Harle, J.R., Malthiéry, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(1), 375-380 (1994)), 1 µl d'un tampon 10 fois concentré en Taq polymérase standard et 8 µl d'eau.

Puis on mélange 1 µl d'*oligo CCK 5'* à 250 ng/µl, 1 µl d'*oligo CCK amid* à 250 ng/µl, 1 µl dNTP à 10 mM chacun, 1 µl d'ADN banque ADNc à 250 ng/µl, 5 µl de tampon 10 fois concentré de l'enzyme Taq polymérase, 2 µl MgCl₂ à 25 mM, 1 µl de la dilution D₁ et 37 µl d'eau.

- 25 Les conditions d'amplification sont les suivantes : on effectue d'abord un traitement thermique de 5 minutes à 95°C, puis on renouvelle 30 cycles. Les dénaturations se font pendant 45 secondes à 95°C, l'hybridation pendant 30 secondes à 60°C et l'élongation pendant 1 minute à 72°C. Enfin, un cycle supplémentaire est mené avec une élongation de 10 minutes à 72°C.

1.5. Résultat.

Le séquence brute suivante est obtenue :

GTG TGT CTG TGC GTG GTG ATG GCA GTC CTG GCA GCA GGC GCC CTG
GCG CAG CCG GTA GTC CCT GTA GAA GCT GTG GAC CCT ATG GAG CAG
5 CGG GCG GAG GAG GCG CCC CGA AGG CAG CTG AGG GCT GTG CTC CGA
CCG GAC AGC GAG CCC CGA GCG CGC CTG GGC GCA CTG CTA GCC CGA
TAC ATC CAG CAG GTC CGC AAA GCT CCC TCT GGC CGC ATG TCC GTT
CTT AAG AAC CTG CAG GGC CTG GAC CCT AGC CAC AGG ATA AGT GAC
CGG GAC TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTC GGC CGG CGC AGT GCT GAG

10 La traduction en acides aminés de la séquence obtenue aboutit à :

VCLCVV	MAVLAAGALA	QPVVPVEAVD	PMEQRAEEAP
RRQLRAVLRP	DSEPRARLGA	LLARYIQQVR	KAPSGRMSVL
KNLQGLDPSH	RISDRDYMGW	MDFGRRSAE	

permet bien de retrouver la séquence nucléotidique du précurseur de la CCK (dont la séquence a été fournie par la banque de données Swiss Prot n° p01355).

L'abréviation des acides aminés est la suivante :

Alanine	A	Leucine	L
Argine	R	Lysine	K
Acide aspartique	D	Méthionine	M
Asparagine	N	Phénylalanine	F
Cystéine	C	Proline	P
Acide glutamique	E	Sérine	S
Glutamine	Q	Thréonine	T
Glycine	G	Tryptophane	W
Histidine	H	Tyrosine	Y

Revendications

1. Oligonucléotide OX simple brin, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions douces avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.
2. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.
3. Oligonucléotide OX selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que Y1 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.
4. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que Y5 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.
5. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que, dans OY, Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9, dans laquelle Y6 représente un trinucéotide codant pour Ser, Thr, ou Tyr, Y7 représente un trinucéotide codant pour un acide aminé quelconque, Y8 représente un trinucéotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant de 1 à 12 nucléotides.
6. Oligonucléotide OX selon la revendication 5, caractérisé en ce que Y1 et Y9 sont supprimés dans l'oligonucléotide OY.
7. Oligonucléotide OX selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il peut s'hybrider avec ledit oligonucléotide OY dans lequel Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly,

16. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- hybridation d'un ou plusieurs oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec ladite banque d'ADN;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

18. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et d'un autre ensemble d'oligonucléotides selon la revendication 14;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

20. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

Revendications

1. Oligonucléotide OX simple brin, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions douces avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

2. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

3. Oligonucléotide OX selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que Y1 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.

4. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que Y5 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.

5. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que, dans OY, Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9, dans laquelle Y6 représente un trinucéotide codant pour Ser, Thr, ou Tyr, Y7 représente un trinucéotide codant pour un acide aminé quelconque, Y8 représente un trinucéotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant de 1 à 12 nucléotides.

6. Oligonucléotide OX selon la revendication 5, caractérisé en ce que Y1 et Y9 sont supprimés dans l'oligonucléotide OY.

7. Oligonucléotide OX selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il peut s'hybrider avec ledit oligonucléotide OY dans lequel Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly,

- 17

- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

16. Méthode selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire selon la revendication 14.

5 17. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;

10 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et d'un autre ensemble d'oligonucléotides simple brin OZ, caractérisés en ce qu'ils comprennent de 15 à 39 nucléotides et sont capables de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées, ladite séquence ayant pour formule Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 dans laquelle Z1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z1 est
15 supprimé, Z2 et Z3 représentent deux trinucleotides codant pour Leu, Z4 et Z5 représentent deux trinucleotides codant pour deux acides aminés quelconques, Z6 représente un trinucleotide codant pour Leu, et Z7 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z7 est supprimé;

20 - identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

25 18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 14 ou une librairie combinatoire d'oligonucléotides simple brin OZ, lesdits oligonucléotides OZ étant caractérisés en ce qu'ils comprennent de 15 à 39 nucléotides et sont capables de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées, ladite séquence ayant pour formule Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 dans laquelle Z1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z1 est
30 supprimé, Z2 et Z3 représentent deux trinucleotides codant pour Leu, Z4 et Z5 représentent deux trinucleotides codant pour deux acides aminés quelconques, Z6 représente un trinucleotide codant pour Leu, et Z7 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z7 est supprimé.

24. Méthode selon l'une quelconque des revendications 15 à 23, caractérisée en ce que l'oligonucléotide simple brin est détectable à l'aide d'un agent de marquage, tel que le ^{32}P ou la digoxygénine.

C
T
G
A
G
C
A
C
C
AG
CG
CA
CC
AA
TT
TC
AG
CT
GC
TG
GC
AA
GG

651	GGACTATAAA	GATACCAGGC	GTTTCCCCCT	GGAAGCTCCC	TCGTGCGCTC
701	TCCTGTTCCG	ACCCTGCCGC	TTACCGGATA	CCTGTCCGCC	TTTCTCCCTT
751	CGGGAAGCGT	GGCGCTTTCT	CATAGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTCG
801	GTGTAGGTCG	TTCGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC	CCCCCGTTCA
851	GCCCGACCGC	TGCGCCTTAT	CCGGTAACTA	TCGTCTTGAG	TCCAACCCGG
901	TAAGACACGA	CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTGGTAA	CAGGATTAGC
951	AGAGCGAGGT	ATGTAGGCGG	TGCTACAGAG	TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA
1001	CTACGGCTAC	ACTAGAAGGA	CAGTATTTGG	TATCTGCGCT	CTGCTGAAGC
1051	CAGTTACCTT	CGGAAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCCGG	CAACAAACC
1101	ACCGCTGGTA	GCGGTGGTTT	TTTTGTTTGC	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG
1151	AAAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG	GGGTCTGACG
1201	CTCAGTGGA	CGAAAACTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA
1251	AAAAGGATCT	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAAATGAA	GTTTTAAATC
1301	AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA
1351	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTGCTTC	ATCCATAGTT
1401	GCCTGACTCC	CCGTCGTGTA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC
1451	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG
1501	ATTTATCAGC	AATAAACCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT
1551	CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC
1601	TAGAGTAAGT	AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGGCATTG
1651	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCGT	TTGGTATGGC	TTCATTACAGC
1701	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
1751	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTCAGA	AGTAAGTTGG